Iranian Journal of Pulses Research
Vol. 14, No. 2, December 2023, pp. 209-220
Short Article (Research Outcome)



Homepage: https://ijpr.um.ac.ir/

پژوهش‌های حبوبات ایران
جلد ۱٤، شمارهٔ ۲، نیمهٔ دوم ۱٤۰۲، ص. ۲۲۰-۲۰۹
نوع مقاله: کوتاه (دستاورد پژوهشی)

https://doi.org/10.22067/ijpr.2023.77619.1039

Introduction of an *in vitro* Pathogenicity Test of *Ascochyta rabiei* on Chickpea Leaves Detached from Resistant and Susceptible Cultivars

Fariba Ramezani Khozestani[1], Fatemeh Zaker Tavallaie[2]*, Farhad Shokouhifar[3], Mojtaba Mamarabadi[4]

Received: 19-07-2022 Revised: 11-12-2022 Accepted: 26-04-2023 Available Online: 21-02-2024	**Cite this article:** Ramezani Khozestani, F., Zaker Tavallaie, F. Shokouhifar, F., & Mamarabadi, M. (2023). Introduction of an *in vitro* pathogenicity test of *Ascochyta rabiei* on chickpea leaves detached from resistant and susceptible cultivars. *Iranian Journal of Pulses Research*, *14*(2), 211-222. (In Persian with English Abstract). https://doi.org/10.22067/ijpr.2023.77619.1039

Introduction

Chickpea (*Cicer arietinum* L.) is considered as one of the rich sources of plant protein in human diet and an important factor in soil fertility which has of special position in the crop rotation programs. In Iran, chickpea is grown in spring and autumn. Ascochyta blight is currently considered as the most important limiting factor of winter cultivation of chickpea in Iran. Identifying sources of resistance to Ascochyta blight by performing screening tests using artificial inoculation is one of the common methods in plant breeding. The cost and risks of spreading the diversity of pathogenic fungi due to the use of infected plots are among the limitations of alternative studies. Providing a reliable *in vitro* screening method besides speeding up the breeding programs can overcome many of these limitations.

Materials and Methods

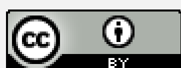
Two chickpea seed samples were selected in the presented study which were including; MCC133 and ILC1929, respectively, as resistant and susceptible lines to Ascochyta blight. The seed samples were provided by the seed bank of the Research Center for Plant Sciences of Ferdowsi University of Mashhad, Iran. The fungal isolates called PI (Pathotype No. 1), related to *Ascochyta rabiei* with strain number of FUM 1001 was obtained from the Microorganisms Collection of Ferdowsi University of Mashhad (WDCM 1207), Iran. The germinated chickpea seeds were planted in pots containing equal proportions of leached sterilized coco peat and perlite. The pots were kept in a growth chamber at 24±2 °C and 16:8 h light/dark photoperiod and fertilized weekly by ZISTA nutritional plant solution up to 5 leaves. Three leaves were detached from each seedling and placed under sterile conditions in test tubes. The durability and growth potential of surface and endogenous infections on chickpea leaves detached from the seedlings grown in greenhouse condition were investigated after surface disinfection and culture under in vitro condition without nutrient medium. Moreover, the severity and rate of disease symptoms development as a result of applying two inoculation methods were compared on detached leaves separated from susceptible cultivar. In addition, the possibility of differentiation of resistant and susceptible genotypes was investigated in response to a virulent pathotype. In the final stage, the possibility of differentiation of different fungal pathotypes was evaluated based on pathogenicity on resistant cultivar.

Results and Discussion

Our daily visual observation showed that, no signs of fungal growth or symptoms of infection related to saprophytes were observed on detached leaves inside the test tube until the tenth day. The leaves were completely fresh until the tenth day and there were no symptoms of wilting on them. On the tenth day, a number of leaf samples had slightly reduced their greenness, but were perfectly healthy. The results showed that using this method the detached leaves can be stored safely in the test tube for at least 10 days. In addition, the method of preparing the leaves has prevented any surface infection. The results of pathogenicity test showed a clear difference between the disease

---

1 and 2- M.Sc. and Assistant Professor, Department of Production Engineering and Plant Genetics, Shirvan Agriculture Faculty, University of Bojnord, Bojnord, Iran, respectively.
3- Assistant Professor, Research Center for Plant Sciences, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.
4- Associate Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.
* Corresponding Author: f.zaker.t@um.ac.ir



symptoms in the two inoculation methods. Symptoms of the disease were visible on the leaves of susceptible cultivars in the immersion method from the third day in the form of very small spots resulting from the destruction of the cuticular layer on the leaf surface. These symptoms were strengthened on the fifth day. Disease development was increased rapidly in the whole leaf and the wounds were quite visible on the eighth day. In the drip method, no visible symptoms were visible until the eighth day, and on the tenth day, the wounds were observed at the site of inoculation. The results indicate that the immersion method induces quicker symptom development on leaflets, with a more rapid and widespread effect across the entire leaf. Additionally, owing to the limited survival period of detached leaves, this method facilitates faster symptom manifestation within a relatively shorter timeframe. Thus, inoculation by immersion method has a higher efficiency in the occurrence of Ascochyta blight disease symptoms. The disease symptoms observed on the leaves are due to the activity of a wide range of compounds produced by the fungus, including plant tissue degrading enzymes, toxins and fungal metabolites that are toxic to the plant. Investigation on gene expression pattern of *A. rabiei* in the early hours of plant infection has shown an increase in the expression of different gene families which can cause symptoms on the plant by destroying the cuticle of the leaf surface and cell wall in the early stages of infection.

Conclusions

Taken together, these results showed that the invented method of testing the pathogenicity inside the test tube is well able to distinguish resistant and sensitive cultivars from each other. Accordingly, this method can be used in selection studies and evaluation of resistance of chickpea samples against infection with *A. rabiei* isolates.

Keywords: Ascochyta blight of chickpea, Differentiation of resistance level, *In vitro* selection, Quantitative damage degree

پژوهش‌های حبوبات ایران
جلد ۱٤، شمارۀ ۲، نیمۀ دوم ۱٤۰۲، ص. ۲۲۰-۲۰۹
نوع مقاله: کوتاه (دستاورد پژوهشی)



Iranian Journal of Pulses Research
Vol. 14, No. 2, December 2023, pp. 209-220
Short Article (Research Outcome)
Homepage: https://ijpr.um.ac.ir/

https://doi.org/10.22067/ijpr.2023.77619.1039

معرفی روش درون‌شیشه‌ای آزمون بیماری‌زایی قارچ *Ascochyta rabiei* روی برگ‌های جدا شده ارقام نخود مقاوم و حساس

فریبا رمضانی خوزستانی[۱]، فاطمه ذاکر تولایی[۲*]، فرهاد شکوهی فر[۳]، مجتبی ممرآبادی[٤]

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۴/۲۸
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۲/۰۶

چکیده

شناسایی منابع مقاومت به بیماری برق‌زدگی با انجام آزمایش‌های به‌گزینی در شرایط آلودگی مصنوعی عامل بیماری یکی از روش‌های مرسوم در اصلاح نباتات به‌شمار می‌رود. هزینه‌بر بودن و مخاطرات ظهور و گسترش پاتوتیپ‌های جدید در اثر استفاده از پلات‌های آلوده، از جمله محدودیت‌های مطالعات به‌گزینی محسوب می‌شوند. فراهم شدن یک روش به‌گزینی قابل اعتماد در شرایط درون شیشه‌ای می‌تواند علاوه‌بر سرعت بخشیدن به برنامه‌های اصلاحی، بسیاری از این محدودیت‌ها را برطرف نماید. بدین منظور، ابتدا ماندگاری و احتمال رشد آلودگی‌های سطحی و درون‌زاد، روی برگ‌های جدا شده از گیاهچه‌های رشد یافته در شرایط گلخانه مربوط به دو ژنوتیپ نخود به‌نام‌های MCC133 (مقاوم) و ILC1929 (حساس) پس از ضدعفونی سطحی و کشت در شرایط درون شیشه‌ای بدون بستر کشت مغذی، مورد بررسی قرار گرفت. همچنین شدت و سرعت بروز علائم بیماری ناشی از مایه‌زنی قارچ *Ascochyta rabiei* به دو روش قطره‌ای و غوطه‌وری مورد مقایسه قرار گرفت. به‌علاوه امکان تمایز ژنوتیپ‌های مقاوم و حساس در پاسخ به پاتوتیپ PI بررسی شد. در مرحله پایانی، امکان تمایز پاتوتیپ‌های مختلف قارچ بر اساس قدرت بیماری‌زایی روی رقم مقاوم، ارزیابی شد. نتایج نشان داد که برگ‌های جدا شده از گیاه تا پس از گذشت ۱۰ روز در شرایط درون شیشه بدون مواد مغذی و بدون بروز علائم کمبود قابل نگهداری هستند و روش آماده‌سازی برگ‌ها از بروز هرگونه آلودگی سطحی جلوگیری نموده است. نتایج آزمون بیماری‌زایی نشان داد که تلقیح به‌روش غوطه‌ورسازی در مقایسه با روش قطره‌ای با راندمان بالاتری سبب بروز علائم می‌شود. در مجموع، این نتایج نشان می‌دهد که روش آزمون بیماری‌زایی درون شیشه‌ای ابداع شده به‌خوبی قادر است، ارقام را بر اساس سطح مقاومت از یکدیگر متمایز نماید و بر این اساس، می‌توان از این روش در مطالعات به‌گزینی و ارزیابی سطح مقاومت نمونه‌های گیاهی در مقابل آلودگی با جدایه‌های قارچ *A. rabiei* استفاده نمود.

واژه‌های کلیدی: به‌گزینی درون شیشه؛ بیماری برق‌زدگی نخود؛ تمایز سطح مقاومت؛ درجه خسارت کمّی

مقدمه

قارچ *Ascochyta rabiei* عامل بیماری برق‌زدگی نخود در محدوده دمایی ۱۰ تا ۲۰ درجه سلسیوس و رطوبت نسبی بیش از ۶۰ درصد قادر است، به‌سرعت توسعه یافته و خسارت شدیدی به مزارع این محصول در سراسر دنیا وارد سازد (Singh & Saxena, 1993). در حال حاضر، این بیماری در شرایط رطوبت و دمایی مناسب خسارت جدی به زراعت نخود وارد می‌آورد و یکی از عوامل اصلی محدودکننده در کشت‌های زمستانه نخود به‌شمار می‌رود (Kanouni *et al.*, 2011; Pande *et al.*, 2005; Tutwiler, 1995). فرم غیرجنسی قارچ به تمامی قسمت‌های گیاه حمله می‌کند (Kaiser, 1973). در ایران، این بیماری از مناطق شمال غرب، غرب، جنوب غربی و بخش‌هایی از مرکز کشور مشاهده شده است. در مطالعات صورت گرفته بر روی جمعیت این قارچ در ایران با جداسازی ۹۶ جدایه از مزارع کشت نخود از ۱۶ استان و تعیین

۱ و ۲- به‌ترتیب کارشناسی ارشد و استادیار، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی شیروان، دانشگاه بجنورد، بجنورد، ایران.
۳- استادیار گروه پژوهشی بقولات، پژوهشکده علوم گیاهی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.
۴- دانشیار گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.
(*- نویسنده مسئول: f.zaker.t@um.ac.ir)

قدرت بیماری‌زایی آن‌ها، شش پاتوتیپ شامل پاتوتیپ PI تا پاتوتیپ PVI شناسایی شده است و الگوی گسترش آن‌ها در کشور تعیین شده است (Shokouhifar *et al.*, 2003).

مطالعات متعددی جهت شناسایی منابع مقاومت به بیماری برقزدگی روی ژرم‌پلاسم نخود در کشورهای مختلف با استفاده از روش‌های مختلف انجام شده است (Nene *et al.*, 1981; Toker & Çanci, 2003). مطالعات گزینشی متعددی در شرایط گلخانه و پلات‌های آلوده در مزرعه انجام شده است (Haware *et al.*, 1995; Nasir *et al.*, 2000; Shokouhifar *et al.*, 2006; Rani *et al.*, 2020).

هرچند روش ارزیابی ژرم‌پلاسم در شرایط طبیعی می‌تواند نتایج قابل اعتماد تری ارائه نماید، ولی این روش از نظر اجرایی دارای دشواری‌هایی هست، به‌عنوان مثال ایجاد شرایط ایزوله جهت جلوگیری از گسترش پاتوتیپ‌های غیر بومی قارچ در یک منطقه همواره با مشکلات زیادی همراه است. همچنین، فراهم شدن شرایط تکثیر جنسی در صورت مهیا بودن جدایه‌های دارای تیپ‌های زایشی سازگار می‌تواند به بروز و شیوع جدایه‌های بیماری‌زای جدید در منطقه تحت آزمایش منجر شوند. از سوی دیگر، روش مذکور تنها به شرایط آب و هوایی خاص محدود می‌شود و تنها یک مرتبه در سال امکان انجام دارد.

تعدادی از ارزیابی‌های اولیه و یا تأیید نمونه‌های گزینش شده در مزرعه، در شرایط کنترل شده گلخانه و یا اتاقک‌های رشد انجام شده است (Haware *et al.*, 1995; Shokouhifar *et al.*, 2006; Pastor *et al.*, 2022). در شرایط کنترل شده مانند گلخانه یا اتاقک رشد می‌توان با کنترل کامل دما، نور و رطوبت امکان شیوع بیماری را تا حد زیادی بهینه‌سازی نمود و از سوی دیگر، می‌توان آزمایش‌هایی را به‌صورت تکرارپذیر چندین مرتبه در سال انجام داد، و از همه مهم‌تر می‌توان از گسترش جدایه‌های بیماری‌زا در منطقه تحت آزمایش جلوگیری نمود، ولی با این روش تعداد نمونه‌های محدودی قابل ارزیابی هستند و مهیا کردن چنین شرایط کنترل‌شده‌ای هزینه‌بر می‌باشد.

از شرایط درون شیشه نیز برای گزینش منابع مقاومت به بیماری برقزدگی استفاده شده است (Singh *et al.*, 1999; Kadiri *et al.*, 2019). به‌دلیل ایزوله بودن شرایط به‌کارگیری جدایه‌های قارچ، قابلیت کنترل و تکرارپذیری این روش می‌تواند از جنبه‌های مختلفی کار ارزیابی سطح مقاومت نمونه‌های گیاهی را بهبود بخشد. قابل تکثیر بودن و امکان حفظ نمونه‌های گیاهی و رفع محدودیت‌های زمانی و تعداد نمونه قابل ارزیابی از دیگر مزیت‌های این روش به‌شمار می‌رود.

هرچند، اجرای این روش به امکانات آزمایشگاهی نیازمند است، ولی مهم‌ترین نگرانی در این روش به حساسیت بافت‌های گیاهی معطوف می‌شود که در شرایط درون شیشه‌ای (*In vitro*) رشد یافته‌اند. اینکه بسیاری از عوامل دفاعی گیاه در شرایط درون شیشه مشابه با شرایط رشد طبیعی رشد و نمو نمی‌یابند، می‌تواند باعث شود تا ابزارهای دفاعی غیرفعال گیاه از جمله عوامل فیزیکی و شیمیایی در سطح گیاه کامل نشوند (Shahid *et al.*, 2008Bahr *et al.*, 2016;) و یا به‌دلیل رطوبت اشباع درون شیشه، روزنه‌های گیاه کاملاً باز باشند و مسیری برای نفوذ سریع و حساسیت بیشتر در مقابل حمله بیمارگر ایجاد شود (Eastburn *et al.*, 2011). برای رفع این مشکلات، روشی مورد نیاز است تا حد امکان گیاه در شرایط طبیعی‌تری رشد یافته باشد.

این مطالعه با هدف ابداع و بهینه‌سازی یک روش آزمون بیماری‌زایی در شرایط درون شیشه انجام شد و کارآمدی آن در آزمون بیماری‌زایی پاتوتیپ PI از قارچ *A. rabiei* روی یک رقم نخود حساس و همچنین قابلیت آن در تمایز ارقام نخود مقاوم و حساس به بیماری برقزدگی مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

مواد زیستی

بذور دو نمونه نخود شامل لاین‌های MCC133 (Shokouhifar *et al.*, 2006) و ILC1929 (Shokouhifar *et al.*, 2003; Singh & Reddy, 1983) به‌ترتیب به‌عنوان نمونه‌های مقاوم و حساس در برابر بیماری برقزدگی از بانک بذر پژوهشکده علوم گیاهی دانشگاه فردوسی مشهد تهیه شد. جدایه مربوط به پاتوتیپ PI از قارچ *A. rabiei* (Shokouhifar *et al.*, 2003) با شماره دسترسی FUM 1001/(Pathotype No. 1) از بانک ریزجانداران دانشگاه فردوسی مشهد Microorganisms Collection of Ferdowsi University of Mashhad (WDCM 1207) تهیه شد.

آماده‌سازی نمونه‌های گیاهی

بذور با ظاهری سالم مربوط به نمونه‌های گیاهی مورد مطالعه انتخاب شد و به‌مدت ۲۰ دقیقه درون محلول هیپوکلریت سدیم یک درصد ضدعفونی شدند و سپس سه مرتبه هر بار به‌مدت ۱۰ دقیقه با آب مقطر استریل شستشو داده شدند. بذور درون پتری دیش‌های حاوی کاغذ صافی مرطوب و استریل کشت گردیده و تا زمان جوانه‌زنی در دمای ۲۲ درجه

سلسیوس و در تاریکی نگهداری شدند. بذور فاقد آلودگی و جوانه‌زده به گلدان‌های حاوی نسبت مساوی از کوکوپیت و پرلیت استریل آبشویی شده منتقل شدند و در فضای اتاقک رشد با شرایط دمایی ۲۴ درجه سلسیوس و دوره روشنایی ۱۶ ساعته منتقل شده و تا زمان پنج برگی نگهداری شدند.

تثبیت برگ نمونه‌های گیاهی در شرایط این ویترو

جهت کشت از لوله‌های آزمایش با قطر ۲۵ میلی‌متر استفاده شد، انتهای لوله‌ها تا ارتفاع دو سانتی‌متری پنبه قرار داده شد و پس از اضافه کردن پنج میلی‌لیتر آب مقطر درب لوله‌های با درپوش‌های پنبه‌ای پوشانده شد و به‌مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس اتوکلاو گردید. از هر گیاهچه سه برگ از جوان‌ترین برگ‌های کاملاً توسعه‌یافته، جداسازی شد و سپس در محلول هیپوکلریت سدیم یک درصد به‌مدت ۱۰ دقیقه ضدعفونی شدند و بعد از آن، سه مرتبه با آب مقطر استریل شستشو گردیدند. دمبرگ‌ها در بستر استریل پنبه درون لوله‌های آزمایش کشت شد و درب شیشه‌ها با پارافیلم پوشانده شد. لوله‌های آزمایش در دمای ۱۸ درجه سلسیوس و دوره روشنایی ۱۲ ساعت برای مدت ۱۰ روز نگهداری شدند. ماندگاری برگ‌ها و آلودگی احتمالی آن‌ها به‌صورت روزانه مشاهده و تصویربرداری شد.

آماده‌سازی سوسپانسیون اسپور قارچ *A. rabiei*

جدایه مربوط به پاتوتیپ PI قارچ *A. rabiei* روی محیط CSMA[1] (چهار گرم پودر بذر نخود، سه گرم دکستروز، ۱/۸ گرم آگار در حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر) کشت شدند و در دمای ۱۸ درجه سلسیوس با دوره روشنایی ۱۴ ساعت در شبانه روز به‌مدت دو هفته مطابق با دستورالعمل گزارش شده (Udupa & Weigand, 1997) نگهداری گردید. جهت تهیه سوسپانسیون اسپور، قطعات کوچکی از محیط کشت از حاشیه پرگنه‌های درحال رشد جداسازی شد و در ارلن ۵۰۰ میلی لیتری حاوی ۱۰۰ میلی لیتر از محیط مایع CSMB (CSMA فاقد آگار) کشت شدند و به‌مدت ۱۴ روز در دمای ۱۸ درجه سلسیوس نگهداری شدند، سپس محیط کشت مایع حذف شد و ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل به توده قارچی رشد یافته اضافه شد. در مرحله بعد، به‌مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۱۲۵ دور در دقیقه به هم زده شد تا اسپورهای درون پیکنیدیوسپورها آزاد شوند. سوسپانسیون اسپور حاصل با عبور محتویات ارلن از میان باند استریل از توده میسلیومی قارچ جداسازی شد. غلظت اسپورها با لام هموسایتومتر تعیین شد و در نهایت، به غلظت $1/6 \times 10^5$ اسپور در میلی‌لیتر رسانده شد و به‌صورت تازه جهت مرحله مایه‌زنی مورد استفاده قرار گرفت.

مایه‌زنی برگ‌های ژنوتیپ‌های نخود درون شیشه

برگ‌های تثبیت شده درون لوله‌های آزمایش با دو روش مایه‌زنی شدند. در روش اول، ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون اسپور، در شرایط استریل به‌صورت قطره‌ای در نقاط مختلف روی برگچه‌ها قرار داده شد. در روش دوم، برگ‌ها به‌طور کامل به‌مدت ۲۰ ثانیه در سوسپانسیون اسپور غوطه‌ور شدند و بعد روی کاغذ صافی استریل، رطوبت اضافه آن‌ها گرفته شد و مجدد درون لوله‌های آزمایش قرار گرفتند. مایه‌زنی سوسپانسیون پاتوتیپ PI روی هر ژنوتیپ در سه تکرار انجام شد. پس از مایه‌زنی، لوله‌های حاوی نمونه‌ها برای مدت ۲۴ ساعت در تاریکی و دمای ۱۸ درجه سلسیوس نگهداری شدند و پس از آن به شرایط دمایی و نوری قبل بازگردانده شدند.

تصویربرداری و تعیین درجه خسارت

وضعیت علائم ناشی از مایه‌زنی قارچ روی برگ‌ها به‌صورت روزانه تا مدت ۱۰ روز تصویربرداری شد. مقایسه میزان خسارت وارد شده به ارقام مختلف به‌صورت مشاهده‌ای و کمّی انجام گرفت. برای کمّی‌سازی میزان خسارت با توجه به علائم مشاهده شده یک روش تعیین خسارت ابداع شد. در این روش، درجه کمّی خسارت بر اساس حاصل ضرب تعداد برگچه‌های دارای علائم در ضریب هر خسارت، مطابق با جدول ۱ تعیین شد. محاسبات مربوط مطابق با جدول ۱، در نرم‌افزار اکسل انجام شد. مقایسه میانگین درجه کمّی خسارت وارد شده به هر ژنوتیپ در مقابل مایه‌زنی با سوسپانسیون اسپور پاتوتیپ PI در سه تکرار با نرم‌افزار اکسل به‌صورت گراف رسم شد و میانگین خسارت برای هر نمونه براساس داده‌های مربوط به تکرارها محاسبه شد و به‌منظور مقایسه میزان خسارت نوارهای خطای استاندارد (Error bar) روی میانگین خسارت نشان داده شد.

1- Chickpea Seed Meal Agar (CSMA)

جدول ۱- علائم بیماری و ضرایب آن‌ها جهت تعیین درجه کمّی خسارت بیماری برقزدگی روی برگ‌های جدا شده نخود در شرایط درون شیشه

Table 1- Symptoms of the disease and their coefficients to determine the quantitative degree of damage caused by the *Ascochyta* blight on the separated leaves of chickpeas under glass conditions

علائم مشاهده شده **Observed symptoms**	ضریب **Factor**
تعداد زخم محدود زیر یک میلی‌متر The number of limited wounds below one mm	1
تعداد زخم نیمه توسعه یافته بین یک تا سه میلی‌متر The number of semi-developed wounds between 1 and 3 mm	2
تعداد زخم توسعه یافته بزرگ‌تر از سه میلی‌متر The number of developed wounds greater than three mm	3
تعداد برگ‌های دارای زخم‌های با حاشیه زردی The number of leaves with wounds with yellow margins	4
تعداد برگچه‌های دارای زخم و زردی کامل برگچه The number of leaflets with wounds and complete yellowing of leaflets	5
تعداد برگچه‌های سیاه شده The number of blackened leaves	6
تعداد برگچه‌های سیاه شده ریزش کرده The number of fallen blackened leaves	7

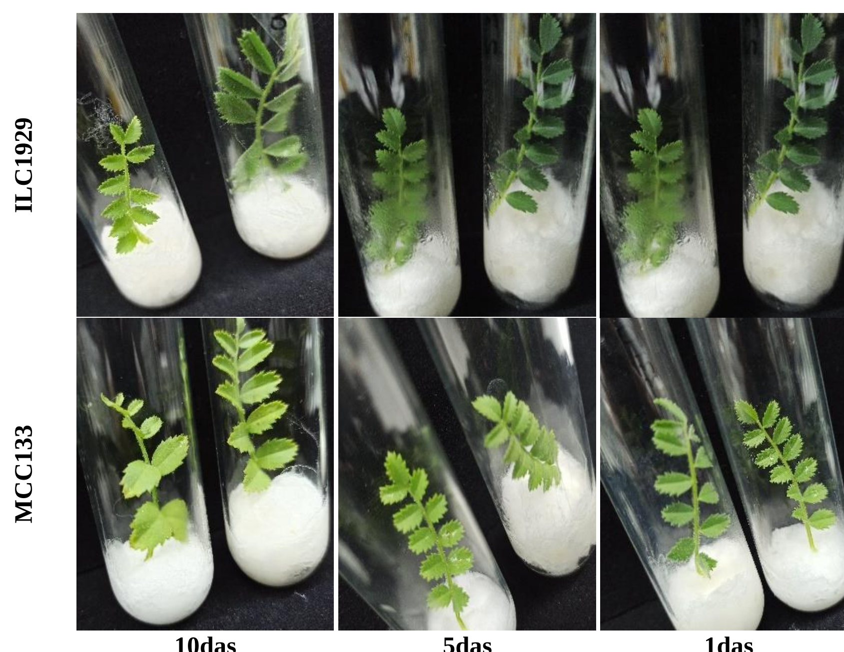
نتایج و بحث

ارزیابی ماندگاری برگ‌های جدا شده در شرایط درون شیشه بدون بستر کشت مغذی

نتایج ارزیابی برگ‌های جدا شده مربوط به دو نمونه نخود ILC1929 (حساس) و MCC133 (مقاوم) بر اساس بررسی وضعیت ظاهری برگ‌های جدا شده درون شیشه تا روز دهم، هیچ گونه علائمی از رشد قارچ و یا آلودگی مربوط به ساپروفیت‌ها قابل مشاهده نبود (شکل ۱). برگ‌ها تا روز دهم کاملاً شاداب بودند و علائم پژمردگی در آن‌ها دیده نشد. در روز دهم، در تعدادی از نمونه‌ها، کمی از سبزی برگ‌ها کاسته شده بود، ولی کاملاً سالم بودند. نتایج به‌دست آمده از مرحله ارزیابی ماندگاری برگ‌های جدا شده در شرایط درون شیشه بدون بستر کشت مغذی، نشان داد برگ‌های جدا شده را با این روش، حداقل برای مدت ۱۰ روز می‌توان درون شیشه سالم نگهداری نمود. همچنین، گیاهان آماده شده فاقد آلودگی درون‌زاد بودند و روش ضدعفونی سطحی به‌کار گرفته شده مانع از رشد آلودگی‌های سطحی شد، عدم تداخل ساپروفیت‌ها و یا آلودگی‌های درون‌زاد روی نمونه‌های درون شیشه، برای بررسی اثرات عامل بیماری مورد مطالعه امری ضروری است.

بر اساس این نتایج می‌توان روش ارائه شده در این مطالعه را برای آماده‌سازی گیاهان سالم در درون شیشه، شامل جوانه‌دار کردن و انتخاب بذور سالم، کشت بذور جوانه‌دار درون گلدان‌های حاوی بستر استریل، نگهداری در گلخانه تا رسیدن به مرحله رشدی مناسب، برداشت و ضدعفونی سطحی برگ‌ها، قرار دادن آن‌ها درون شیشه‌های حاوی پنبه مرطوب استریل فاقد مواد غذایی و مواردی از این قبیل مورد استفاده قرار گیرد.

در مطالعات انجام شده جهت گزینش نمونه‌های مناسب در شرایط درون شیشه‌ای معمولاً از گیاهچه‌ها و ساقه‌های تولید شده از طریق کشت بذر و جنین در محیط کشت استریل استفاده شده است (Singh *et al.*, 1999). گیاهچه‌های تولید شده از این روش‌ها، هرچند کاملاً سالم و عاری از آلودگی هستند، ولی به‌دلیل شرایط رطوبت اشباع و مواد غذایی بالا، معمولاً بافت‌های گیاهی بسیار ترد و حساسی خواهند داشت و در مقایسه با گیاهان رشد یافته در شرایط طبیعی فاقد بسیاری از ساختارهای دفاعی فیزیکی و ترکیبات ثانویه درگیر در سیستم دفاعی می‌باشند، لذا استفاده از روش توصیه شده در مطالعه حاضر می‌تواند در مقایسه با گیاهان سالم تولید شده در شرایط درون شیشه، با شرایط طبیعی گیاه انطباق بیشتری داشته باشد.



شکل ۱- وضعیت برگ‌های جدا شده مربوط به لاین‌های ILC1929 و MCC133 نخود در روزهای ۱، ۵ و ۱۰ روز روز پس از جدا شدن از گیاه مادری و نگهداری درون لوله‌های آزمایش حاوی پنبه استریل مرطوب بدون مواد غذایی

Fig. 1- Durability of leaves detached from the chickpea lines ILC1929 and MCC133 up to 10 days after separation (das) from the mother plant and stored in test tubes containing moist sterile cotton without nutrients

مقایسه دو روش مایه‌زنی قارچ *A. rabiei* روی برگ‌های جداشده از نخود حساس در شرایط درون شیشه

به‌منظور استفاده از برگ‌های جدا شده جهت آزمون بیماری‌زایی در شرایط درون شیشه، ابتدا ضروری است امکان آلوده‌سازی آن‌ها با عامل بیمارگر و روش مؤثر مایه‌زنی برگ‌ها، مورد بررسی قرار گیرد. همچنین بایستی مشخص گردد که پس از مایه‌زنی، برگ‌ها چه علائمی را بروز می‌دهند و چند روز پس از ظهور علائم بیماری می‌توان ارقام مقاوم و حساس را از یکدیگر متمایز نمود.

نتایج، تفاوت آشکاری را میان علائم بروز یافته در دو روش مایه‌زنی نشان داد (شکل ۲). علائم بیماری در برگ‌های رقم حساس در روش غوطه‌ورسازی از روز سوم به‌صورت لکه‌های بسیار کوچک حاصل تخریب لایه کوتیکولی در سطح برگ قابل مشاهده بود (شکل ۲). این علائم در روز پنجم شدت بیشتری یافته و روند توسعه بیماری و بیشتر شدن علائم در کل برگ به‌سرعت افزایش یافت و در روز هشتم، زخم‌ها به‌صورت کاملاً مشهود و بارز قابل مشاهده بودند. در روش مایه‌زنی قطره‌ای تا روز هشتم هیچ گونه علائم ظاهری قابل مشاهده نبود و در روز دهم در محل قرار دادن قطره سوسپانسیون اسپور علائم زخم قابل مشاهده گردید.

نتایج مقایسه دو روش مایه‌زنی نشان داد، روش غوطه‌ورسازی با سرعت بیشتری می‌تواند به بروز علائم بیماری روی برگچه‌ها منجر شده و در کل برگ منتشر شود و با توجه به محدود بودن دوره بقای برگ‌های جدا شده این روش می‌تواند با سرعت بیشتر و در زمان کمتر به بروز علائم آلودگی منجر شود. با توجه به نتایج مطالعات بافت‌شناسی بیماری (Nizam *et al.*, 2010)، انتظار می‌رود در شرایط درون شیشه نیز توسعه قارچ روی گیاهان حساس پس از قرار گرفتن اسپورهای قارچ روی سطح برگ رقم حساس و مهیا شدن شرایط دمایی و رطوبتی مناسب، جوانه‌زنی اسپورها طی ۲۴ ساعت اول آغاز گردد و تا ۴۸ ساعت بعد لوله تندشی روی سطح برگ رشد نموده و یک اپرسوریوم تیپیک (Typical Appressorium) را تشکیل دهند. نفوذ قارچ به‌صورت مستقیم و همچنین از طریق روزنه‌های باز صورت می‌گیرد (Nizam *et al.*, 2010). علاوه‌براین، در شرایط درون شیشه

به‌دلیل باز بودن روزنه‌ها امکان نفوذ قارچ از مسیر روزنه‌ها نیز فراهم می‌باشد و از آنجا که در روش غوطه‌ورسازی تمام سطوح برگ به اسپور آغشته شده‌اند، رخنه قارچ به گیاه با فراوانی بیشتری از سطح و پشت برگ‌ها رخ می‌دهد. لذا، روش غوطه‌ورسازی در مقایسه با روش مایه‌زنی قطره‌ای با سرعت بیشتر و در زمان کمتری به بروز علائم منتج خواهد شد. علائم مشاهده شده روی برگ‌ها، در نتیجه فعالیت طیف گسترده‌ای از ترکیبات تولید شده توسط قارچ می‌باشد که از آن جمله می‌توان به آنزیم‌های تخریب‌کننده بافت گیاهی و سموم و متابولیت‌های قارچی که برای گیاه سمی هستند، اشاره نمود (Annis & Goodwin, 1997; Have *et al*., 2002). بررسی الگوی بیان ژن‌ها قارچ *A. rabiei* در ساعات اولیه آلودگی گیاه افزایش بیان خانواده‌های ژنی کوتیناز (Cutinase)، پکتیناز (Pectinase)، زایلاناز (Xylanase)، سلولازها (Cellulases) و پلی گالاکتورونازها (Ploygalacturonases) را نشان داده است (Fondevilla *et al*., 2015). این ژن‌ها می‌تواند در تخریب کوتیکول سطح برگ و دیواره سلول‌ها در مراحل اولیه آلودگی گردیده و باعث بروز علائم روی گیاه شوند (Tenhaken & Barz, 1991; Motallebi *et al*., 2003).

بررسی واکنش رقم مقاوم MCC133 در مقابل پاتوتیپ PI قارچ *A. rabiei* در شرایط درون شیشه

نتایج ارزیابی برگ‌های جدا شده از گیاهچه‌های MCC133 با استفاده از روش مایه‌زنی غوطه‌ورسازی در سوسپانسیون اسپور پاتوتیپ PI طی ۱۰ روز پس از مایه‌زنی، نشان داد که در مقایسه با علائم مشاهده شده در رقم حساس ILC1929 (شکل ۲- In2)، روی رقم MCC133 (مقاوم) در زمان‌های مشابه، و در پاسخ به پاتوتیپ مشابه (PI)، علائم بسیار محدودتری ظهور یافت (شکل ۳- PI). هرچند، نقاط نکروزه بسیار محدود و کوچک روی برگ‌های این رقم در روز سوم پس از مایه‌زنی قابل مشاهده بود، ولی علائم تا روز دهم به‌صورت محدود باقی مانده و تعداد زخم‌ها در مقایسه با گیاه حساس (شکل ۲-In2) به‌طور ظاهری کمتر بود.



شکل ۲- روند توسعه علائم بیماری برق‌زدگی روی برگ‌های لاین نخود حساس ILC1929 با استفاده از دو روش مایه‌زنی قطره‌ای (In-1) و روش غوطه‌ورسازی (In-2) در سوسپانسیون اسپور پاتوتیپ PI قارچ *Ascochyta rabiei* در فواصل زمانی یک روز تا ۱۰ روز پس از مایه‌زنی (dai1-10)

Fig. 2- The process of Ascochyta blight disease symptoms development on the leaves of the susceptible chickpea cultivar ILC1929 using two inoculation methods; drop inoculation (In-1) and immersion method (In-2) by *Ascochyta rabiei* pathotype I (PI) spore suspension at time intervals of one to 10 days after inoculation (dai1-10)



شکل ۳- روند توسعه علائم بیماری برق‌زدگی روی برگ‌های نخود مقاوم MCC133 در فواصل زمانی یک روز تا ۱۰ روز پس از مایه‌زنی (dai1-10) با استفاده از روش غوطه‌ورسازی در سوسپانسیون اسپور پاتوتیپ PI قارچ *Ascochyta rabiei*

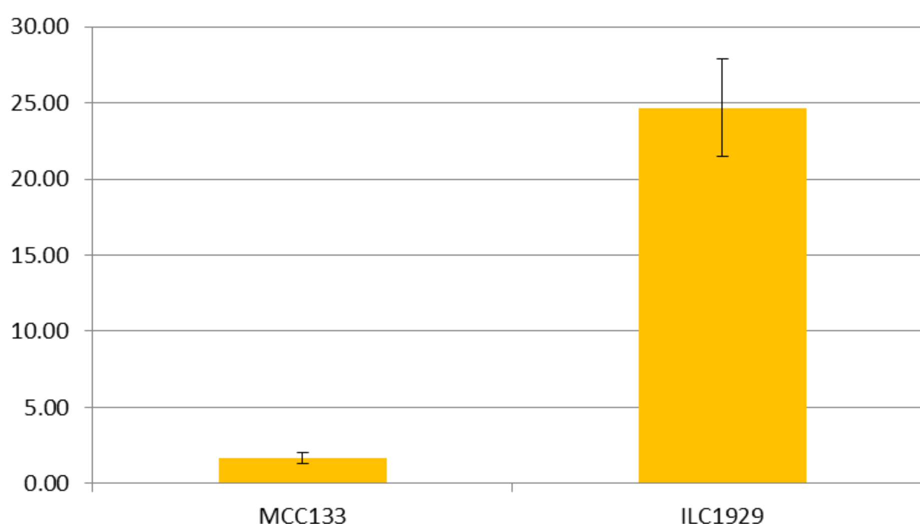
Fig. 3- The process of Ascochyta blight disease symptoms development on the leaves of the resistant chickpea cultivar MCC133 at time intervals of one to 10 days after inoculation (dai1-10) using immersion method in *Ascochyta rabiei* pathotype I (PI) spore suspension

نتایج مرحله تمایز ارقام نخود مقاوم و حساس به قارچ *A. rabiei* با استفاده از روش بهینه‌سازی شده در مقاله حاضر نشان داد، همچون گزارش‌های قبلی نشان داد که لاین MCC133 در مقابل پاتوتیپ PI قارچ در مقایسه با رقم حساس ILC1929 از خود مقاومت نشان می‌دهد و بروز زخم‌هایی با حاشیه محدود، نشان‌دهنده وجود علائم دفاعی در گیاه است که در شرایط درون شیشه نیز فعال شده است. بروز مقاومت در شرایط رطوبتی و دمایی کاملاً مساعد در درون شیشه، نشان می‌دهد، هرچند قارچ توانسته است از موانع فیزیکی عبور کند، ولی رقم MCC133 توانسته است از توسعه قارچ عامل بیماری جلوگیری نماید. درحالی‌که در رقم حساس زخم‌های مشاهده شده با حاشیه نامحدود نشان‌دهنده تداوم توسعه قارچ در برگ‌ها می‌باشد.

ژنوتیپ MCC133 در ارزیابی ژرم‌پلاسم نخود بانک بذر پژوهشکده علوم گیاهی دانشگاه فردوسی مشهد، در مقابل مایه‌زنی با مخلوطی از اسپورهای شش پاتوتیپ شناسایی شده از جمعیت قارچ *A. rabiei* در ایران (Shokouhifar *et al.*, 2003)، سطح مقاومت بالایی را نشان داده است. در شرایط کنترل شده درون گلخانه نیز در هر سه مرحله گیاهچه‌ای، گل‌دهی و غلاف‌دهی، در برابر مخلوط اسپور هر شش پاتوتیپ با بروز حداکثر درجه خسارت سه بر مبنای شاخص نه درجه‌ای (Singh *et al.*, 1981) به‌عنوان یک ژنوتیپ مقاوم در برابر قارچ *A. rabiei* گزارش شده است (Shokouhifar *et al.*, 2006). نتایج این بخش، به‌خوبی نشان داد که در شرایط درون شیشه امکان تمایز ارقام مقاوم و حساس در برابر پاتوتیپ‌های مختلف قارچ *A. rabiei* وجود دارد و می‌توان از این روش برای ارزیابی سطح مقاومت ارقام و نمونه‌های گیاهی جدید استفاده نمود.

تمایز ژنوتیپ‌های مقاوم و حساس به‌روش آزمون بیماری‌زایی درون شیشه

با هدف ارزیابی روش آزمون بیماری‌زایی درون شیشه در تمایز نمونه‌های گیاهی مقاوم و حساس، براساس علائم بیماری مشاهده شده و مطابق با روش کمّی‌سازی علائم (جدول ۱)، درجه خسارت مورد مقایسه قرار گرفت. نتایج به‌خوبی تفاوت درجه خسارت را نمایان ساخت (شکل ۴). نمونه گیاهی مقاوم با متوسط درجه خسارت ۱/۶۷ در مقایسه با نمونه حساس با متوسط درجه خسارت ۲۴/۶۷ کاملاً متمایز بود. دامنه تغییرات درجه خسارت در تکرارهای مربوط به نمونه حساس بسیار بیشتر بود، ولی با این حال امکان تمایز بین دو سطح مقاومت در آزمون درون شیشه به‌طور کامل ممکن است.



شکل ۴- مقایسه میانگین خسارت پاتوتیپ PI قارچ *Ascochyta rabiei* روی برگ‌های جدا شده مربوط به گیاهان نخود مقاوم MCC133 و حساس ILC1929

Fig. 4- Comparison of the mean damage of *Ascochyta rabiei* pathotype PI on isolated leaves of resistant MCC133 and susceptible ILC1929 pea plants

نتیجه‌گیری

در اختیار بودن یک روش آزمون بیماری‌زایی آسان و تکرارپذیر، می‌تواند در راندمان غربال‌گری ژرم‌پلاسم‌های غنی نخود بسیار تأثیرگذار باشد و با کاهش هزینه‌ها و کاهش مخاطرات روش‌های معمول آزمون بیماری‌زایی، امکان دستیابی به منابع مقاومت را به‌طور چشمگیری افزایش دهد. در این مطالعه، ماندگاری برگ‌های جدا شده ارقام مختلف نخود در شرایط درون شیشه، روی بستر نگهداری غیر مغذی تا زمان ۱۰ روز پس از جداسازی بررسی و تأیید شد. همچنین عدم بروز آلودگی‌های درون‌زاد و سطحی در برگ‌های تثبیت شده در شرایط درون شیشه نشان داد که با ضدعفونی سطحی می‌توان نمونه‌های سالمی را برای آزمون بیماری‌زایی مهیا نمود. مقایسه دو روش مایه‌زنی به‌صورت قطره‌ای و غوطه‌ورسازی نشان داد که روش غوطه‌ورسازی در فاصله زمانی کمتری پس از مایه‌زنی سبب بروز علائم بیماری می‌شود و این روش می‌تواند در تمایز ارقام مقاوم و حساس راندمان مناسب‌تری داشته باشد.

نتایج آزمون بیماری‌زایی نشان داد که امکان تمایز پاتوتیپ‌های قارچ *A. rabiei* بر اساس توان بیماری‌زایی و شدت علائم بروز یافته روی رقم مقاوم MCC133 با استفاده از روش ابداع شده در این مطالعه وجود دارد و بدون نیاز به پذیرش مخاطرات روش‌های معمول آزمون بیماری‌زایی می‌توان از این روش جهت تمایز جدایه‌های جمعیت قارچ *A. rabiei* بر اساس توان بیماری‌زایی استفاده نمود و گروه‌های پاتوتیپی را از یکدیگر تفکیک نمود. همچنین شاخص کمّی‌سازی خسارت ارائه شده در مقاله حاضر با تکرارپذیری مناسبی می‌تواند برای تعیین سطح خسارت وارد شده به نمونه‌های گیاهی در شرایط درون شیشه مورد استفاده قرار گیرد.

سپاسگزاری

بدین وسیله از مدیریت پژوهشکده علوم گیاهی دانشگاه فردوسی مشهد به‌سبب مهیا نمودن امکانات آزمایشگاهی و گلخانه‌ای انجام این پایان نامه سپاسگزاری می‌شود. از حمایت‌های مالی معاونت پژوهشی دانشگاه فردوسی مشهد، معاونت پژوهشی دانشگاه بجنورد و دانشکده کشاورزی شیروان تشکر و قدردانی می‌گردد.

References

Annis, S.L., & Goodwin, P.H. (1997). Production and regulation of polygalacturonase isozymes in canadian isolates of leptosphaeria maculans differing in virulence. *Canadian Journal of Plant Pathology*, *19*(4), 358-365. https://doi.org/10.1080/07060669709501060

Bahr, L., Castelli, M.V., Barolo, M.I., Mostacero, N.R., Tosello, M.E., & López, S.N. (2016). Ascochyta blight: Isolation, characterization, and development of a rapid method to detect inhibitors of the chickpea fungal pathogen *Aascochyta rabiei*. *Fungal Biology*, *120*(3), 424-432. https://doi.org/10.1016/j.funbio.2015.12.002

Eastburn, D.M., McElrone, A.J., & Bilgin, D.D. (2011). Influence of atmospheric and climatic change on plant–pathogen interactions. *Plant Pathology*, *60*(1), 54-69. https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2010.02402.x

Fondevilla, S., Krezdorn, N., Rotter, B., Kahl, G., & Winter, P. (2015). In planta identification of putative pathogenicity factors from the chickpea pathogen *Ascochyta rabiei* by de novo transcriptome sequencing using rna-seq and massive analysis of cdna ends. *Frontiers in Microbiology*, 61329. https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01329

Have, A.t., Tenberge, K.B., Benen, J.A., Tudzynski, P., Visser, J., & van Kan, J.A. (2002). The contribution of cell wall degrading enzymes to pathogenesis of fungal plant pathogens. pp. 341-358 in Agricultural Applications. Springer.

Haware, M., Van Rheenen, H., & Prasad, N. (1995). Screening for ascochyta blight resistance in chickpea under controlled environment and field conditions. *Plant Disease*, *79*(2), 132-135. http://dx.doi.org/10.1094/PD-79-0132

Kadiri, A., Boukhatem, Z.F., Halfaoui, Y., & Ighilhariz, Z. (2019). Chickpea callus histology inoculated with *Ascochyta rabiei* blight causal agent spores. *International Journal of Innovative Approaches in Agricultural Research*, *3*(1), 112-122. https://doi.org/10.29329/ijiaar.2019.188.11

Kaiser, W.J. (1973). Factors affecting growth, sporulation, pathogenicity, and survival of *Ascochyta rabiei*. *Mycologia*, *65*(2), 444-457. https://doi.org/10.1080/00275514.1973.12019452

Kanouni, H., Taleei, A., & Okhovat, M. (2011). Ascochyta blight (*Ascochyta rabiei* (pass.) lab.) of chickpea (*Cicer arietinum* l.): Breeding strategies for resistance. *International Journal of Plant Breeding and Genetics*, *5*(1), 1-22. https://doi.org/10.3923/ijpbg.2011.1.22

Motallebi, M., Zamani, M., & Hosseinzadeh-Kalagar, A. (2003). Relationship between polygalacturonase activity and pathogenicity among Iranian isolates of *Ascochyta rabiei*. *Isfahan University of Technology-Journal of Crop Production and Processing*, *6*(4), 159-169.

Nasir, M., Bretag, T., Kaiser, W., Meredith, K., & Brouwer, J. (2000). Screening chickpea germplasm for ascochyta blight resistance. *Australasian Plant Pathology*, *29*(2), 102-107.

Nene, Y., Haware, M., & Reddy, M. (1981). Chickpea diseases: Resistance-screening techniques.

Nizam, S., Singh, K., & Verma, P.K. (2010). Expression of the fluorescent proteins dsred and egfp to visualize early events of colonization of the chickpea blight fungus *Ascochyta rabiei*. *Current Genetics*, *56*(4), 391-399. https://doi.org/10.1007/s00294-010-0305-3

Pande, S., Siddique, K., Kishore, G., Bayaa, B., Gaur, P., Gowda, C., Bretag, T., & Crouch, J. (2005). Ascochyta blight of chickpea (*Cicer arietinum* l.): A review of biology, pathogenicity, and disease management. *Australian Journal of Agricultural Research*, *56*(4), 317-332. https://doi.org/10.1071/AR04143

Pastor, S., Crociara, C., Valetti, L., Peña Malavera, A., Fekete, A., Allende, M.J., & Carreras, J. (2022). Screening of chickpea germplasm for ascochyta blight resistance under controlled environment. *Euphytica*, *218*(2), 1-11. https://doi.org/10.1007/s10681-021-02963-0

Rani, U., Singh, S., Basandrai, A.K., Rathee, V.K., Tripathi, K., Singh, N., Dixit, G.P., Rana, J.C., Pandey, S., & Kumar, A. (2020). Identification of novel resistant sources for ascochyta blight (*Ascochyta rabiei*) in chickpea. *Plos One*, *15*(10), e0240589. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0240589

Shahid, A.A., Husnain, T., & Riazuddin, S. (2008). Ascochyta blight of chickpea: Production of phytotoxins and disease management. *Biotechnology Advances*, *26*(6), 511-515. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.06.001

Shokouhifar, F., Bagheri, A., & Falahat-Rasgar, M. (2006). Identification of resistant chickpea lines against pathotypes causing ascochyta blight disease in Iran. *Iranian Biology Journal*, *19*(1), 29-42. (In Persian with English Abstract)

Shokouhifar, F., Bagheri, A., Falahat-Rastegar, M., & Malekzadeh-Shafaroodi, S. (2003). Pathotyping of *Ascochyta rabiei* isolates in Iran. *Jornal of Agricultural Sciences and Natural Resources*, 37217-232.

Singh, A., Singh, N.P., Gurha, S.N., & Asthana, A.N. (1999). *In vitro* selection against ascochyta blight of chickpea (*Cicer arietinum* l). *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, *8*(2), 117-119. https://doi.org/10.1007/BF03263071

Singh, K., Hawtin, G., Nene, Y., & Reddy, M. (1981). Resistance in chickpeas to *Ascochyta rabiei*. *Plant Disease,* 65586-587.

Singh, K., & Reddy, M. (1983). Inheritance of resistance to ascochyta blight in chickpea. *Crop Science, 23*(1), 9-10.

Singh, K., & Saxena, M. (1993) Breeding for stress tolerance in cool-season food legumes. Wiley Chichester, UK.

Tenhaken, R., & Barz, W. (1991). Characterization of pectic enzymes from the chickpea pathogen *Ascochyta rabiei*. *Zeitschrift für Naturforschung C*, *46*(1-2), 51-57.

Toker, C., & Çanci, H. (2003). Selection of chickpea (*Cicer arietinum* l.) genotypes for resistance to ascochyta blight [*Ascochyta rabiei* (pass.) labr.], yield and yield criteria. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, *27*(5), 277-283.

Tutwiler, R.N. (1995) The great chickpea challenge: Introducing winter sowing in the mediterranean region. ICARDA, Aleppo, Syria.

Udupa, S., & Weigand, F. (1997). Pathotyping of *Ascochyta rabiei* isolates of syria. pp. 39-48 in DNA Markers and Breeding for Resistance to Ascochyta Blight in Chickpea. Proceedings of the Symposium on "Application of DNA Fingerprinting for Crop Improvement: Marker-assisted Selection of Chickpea for Sustainable Agriculture in the Dry Areas". ICARDA, Aleppo, Syria.